文章编号：0454-6296（2000）02-0127-07

5 种中国苏云金芽孢杆菌的伴孢晶体蛋白基因分析

张光美[1]，刘树生[1]，Akhurst Raymond[2]
（1. 浙江大学植物保护系，杭州 310029；2. CSIRO，Division of Entomology，Canberra ACT 2601，Australia）

摘要：利用聚合酶联反应（PCR）和聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）技术分析了 5 种中国苏云金杆菌制剂菌株的伴孢晶体蛋白及其基因组成。结果发现，5 种菌株均含有 *cry1Aa* 和/或 *c* 和/或 *d* 和/或 *b* 基因，只有 Bt+Virus 菌株含有 *cry1Ab* 基因，*cry1A* 基因编码的伴孢晶体蛋白分子量约为 130 kD；仅有 JS-Bt C 菌株含有 *cry1B* 基因，其编码的伴孢晶体蛋白分子量约为 138 kD；除 HB-Bt C 菌株外，其余 4 个菌株均含有 *cry2Aa* 和/或 *b* 基因，这类基因编码分子量为 70 kD 的伴孢晶体蛋白；所有 5 个菌株都含有 *cry1I* 基因，其编码的伴孢晶体蛋白分子量应为 81.2 kD，但实验中未曾检测到 *cry1I* 基因的表达；所有的菌株都不含有 *cry1C* 和 *cry1D* 基因。

关键词：苏云金杆菌；伴孢晶体蛋白基因；PCR 技术；聚丙烯酰胺凝胶电泳
中图分类号：Q965.8　　**文献标识码**：A

苏云金杆菌（*Bacillus thuringiensis* Berliner，简称 Bt）为格兰氏阳性细菌，是目前世界上应用最为成功的微生物杀虫剂，其应用量占整个生物杀虫剂的 90%，而且具有逐渐增大的趋势[1]。通常 Bt 制剂的主要杀虫活性物质为伴孢晶体蛋白和芽孢，有些产品也含有 β-外毒素，这些成分之间具有明显的增效作用[2,3]。伴孢晶体蛋白又称为杀虫晶体蛋白（ICPs）或 δ-内毒素，是苏云金杆菌在形成芽孢时产生的一类蛋白质，对鳞翅目、鞘翅目、双翅目等害虫具有较强的毒杀作用和专一性[4]。这些蛋白由不同的基因编码，根据编码基因的同源性可划分为 18 个主要类别[5]。

随着 Bt 制剂应用量的增大，在室内外已经发现多种害虫对 Bt 的伴孢晶体蛋白产生了不同程度的抗性[6~8]。这样迫使人们一方面对害虫的抗性机理、抗性遗传和进化等进行详细研究，以寻求阻止或克服害虫对 Bt 抗性的途径；另一方面寻找高效的 Bt 菌株和新的伴孢晶体蛋白基因，既能拓宽 Bt 的杀虫谱，又能提高 Bt 的杀虫活性，更为有效地控制害虫。

在我国 Bt 已经用于防治多种重要的农林害虫，近年来不仅其产量大大增加，而且 Bt 商品制剂的品种也逐年增多。由于我国 Bt 基础研究较为薄弱，使用的菌种主要是通过引进，使得生产厂家对有些产品的菌株来源不大清楚，尤其对菌株所包含的伴孢晶体蛋白及其基因知

基金项目：澳大利亚国际农业研究中心（Australia Centre for International Agricultural Research）资助的中澳 PN9213 合作项目的部分研究内容
收稿日期：1997-12-02；修订日期：1999-06-21

之甚少，这样不能为使用者提供足够信息，给害虫对Bt的抗性管理带来很大困难，因而我们认为很有必要对此进行深入研究。

多聚酶联反应（PCR）是一种检测目标DNA序列最为有效和快速的方法[9]，已经被许多学者用于鉴定Bt的伴孢晶体蛋白基因组成和预测它们的杀虫活性[10~13]。本文应用PCR和聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）技术，分析了我国生产的5种Bt制剂菌株的伴孢晶体蛋白及其基因组成。

1 材料与方法

1.1 Bt菌株

5个供试菌株是从我国生产的5种Bt制剂中分离，制剂来源见表1。用于PCR分析的对照菌株包括：HD-1菌株为Bt *kurstaki* 亚种，从Dipel商品制剂（Abbott实验室生产）中分离；Bt-CS1菌株为Bt *aizawai* 亚种；HD-137菌株。所有菌株都保存在LB营养培养基上。

表1 5种苏云金杆菌制剂的来源和特性

Table 1 The sources of the five Chinese *Bacillus thuringiensis* products

制剂代号 Products	剂型 Preparation	产品来源 Manufacturer	效价（IU/mg） Active ingredient
HB-Bt P	粉剂	湖北BT发展和资源中心	18 000
HB-Bt C	悬浮剂	湖北BT发展和资源中心	2 400
Bt + Virus	病毒混合剂	海南南奇生物工程公司	
JS-Bt P	粉剂	江苏扬州生物实验厂	10 000
JS-Bt C	悬浮剂	江苏里下河地区农科所微生物实验厂	8 000

1.2 DNA样品准备

5个供试菌株和3个对照菌株分别接种到LB培养基上，在30℃条件下培养12～16 h；每个菌株挑取单个适当大小菌落，悬浮在50 μL蒸馏水中，煮沸5 min以破碎细胞，待其冷却后，在常温、14 000 r/min离心5 min，收集上清液作为PCR的DNA样品。

1.3 伴孢晶体蛋白基因的PCR扩增

测试的伴孢晶体蛋白基因包括：*cry*1*A*，1*B*，1*C*，1*D*，1*I* 和 *cry*2*A*。选择每个基因的专一性引物对并合成，所有引物对的序列结构、反应产物大小和退火温度等列于表2。HD-1菌株用作 *cry*1*A*、*cry*2*A* 和 *cry*1*I* 基因的对照；Bt-CS1和HD-137菌株用作 *cry*1*C* 和 *cry*1*D* 基因的对照；没有菌株作为 *cry*1*B* 基因的对照；蒸馏水用作每个反应的空白对照。

PCR反应是在FST-320全自动DNA扩增仪上进行，反应温度和反应时间设置如下：进入循环前90℃预变性2 min；然后进入35个循环反应，每个循环为：94℃变性1 min，退火1 min，退火温度根据不同的引物而设定（表2），72℃下延伸1 min 15 s；最后72℃下延伸10 min。取反应产物20 μL在1.5%琼脂糖凝胶电泳。依据反应产物大小确定伴孢晶体蛋白基因的是否存在。

表 2 PCR 反应专一性引物及其特性

Table 2 The characteristics of PCR specific primers used

引物对 Primers	鉴定的基因 Genes identified	产物大小（bp） PCR products	引物序列 The sequences of primers used	退火温度（℃） Annealing temp.	参考文献 References
Lep1A Lep1B	*cry*1*Aa*，*b*， *c*，*d*，*e*	490	5′CCGGTGCTGGATTTGTGTTA3′ 5′AATCCCGTATTGTACCAGCG3′	52	Carozzi *et al*.，1991
Lep2A Lep2B	*cry*1* *cry*1*Ab*	986 908	5′CGAGAAAGTCAAACATGCG3′ 5′ACATGCCCTTTCACGTTCC3′	55	Carozzi *et al*.，1991
Cry1B5 Cry1B3	*cry*1*Ba*	367	5′TTCATCACGATGGAGTAA3′ 5′ATAATTTGGTCGTTCTGTT3′	50	Ceron *et al*.，1994
Cry1C5 Cry1C3	*cry*1*C*	130	5′AAGATCTGGAACACCTTT3′ 5′AAACTCTAAATCCTTTCAC3′	48	Ceron *et al*.，1994
Cry1D5 Cry1D3	*cry*1*D*	290	5′TGCAGCAAGCTATCCAA3′ 5′TTTGAATTGTCAAGGCCTG3′	48	Ceron *et al*.，1994
Cry2A5 Cry2A3	*cry*2*Aa*，*b*	1 070	5′AGATACCCTTGCTCGTGTAA3′ 5′TAGGCCCGTGCTCCACCAGG3′	55	Asono *et al*.，1993
Cry1I5 Cry1I3	*cry*1*Ia*，*b*	1 145	5′GATCCTTGTGTTGAGATA3′ 5′TGAAACTAAAGAATCCAGA3′	55	Gleave *et al*.，1993

* 用此引物产生 986 bp，可鉴定 *cry* 1*Aa*，1*Ac*，1*Ad*，1*Ca*，*b*，1*Db*，1*Ea*，*b*，1*Fa*，*b*，1*Ga*，1*Ha*，*b* 等基因

* This primers produced the 986 bp band with *cry* 1*Aa*，1*Ac*，1*Ad*，1*Ca*，*b*，1*Db*，1*Ea*，*b*，1*Fa*，*b*，1*Ga*，1*Ha*，*b* genes

1.4 DNA 序列分析

由于缺少 *cry*1*B* 基因的对照菌株，为了确定该基因的 PCR 产物，我们对产物进行了克隆和序列分析。整个过程包括：PCR 反应，产物的纯化，DNA 的连接（用 pGEM® -T Vector 作为载体，Promega 公司生产）、转化及筛选，重组质粒 DNA 的制备，在 DNA 自动测序仪上测定其序列。通过 Internet 搜索测定序列的同源基因。

1.5 伴孢晶体蛋白的纯化和 SDS-PAGE

5 种菌株和 HD-1 菌株分别接种在 LB 固体培养基上，30℃下培养 4～5 天，在相差显微镜下检查芽孢高峰期，在产孢高峰期用蒸馏水收集细菌；用超声波破碎细胞，清水洗 2～3 次去除芽孢，加到 90%，80%，70%，60% 的葡萄糖梯度液上[14]，在 4℃低温和真空状态下，25 000 r/min 离心 6.5～12 h；用相差显微镜确定伴孢晶体蛋白带，收集该蛋白带；用蒸馏水悬浮、14 000 r/min 离心 20 min，弃上清液；再用蒸馏水悬浮，同样转速离心 20 min，重复清洗 3～5 次，得到纯化的晶体蛋白。

纯化的伴孢晶体蛋白用于 SDS-PAGE 分析，具体操作参照 Laemmli[15]的方法。

2 结果

2.1 伴孢晶体蛋白基因分析

用上述各种专一性引物对 5 种中国 Bt 菌株的伴孢晶体蛋白基因进行 PCR 扩增得到的反

应产物大小见表 3。综合 Lep 1 和 Lep 2（图 1）两种引物对的 PCR 扩增片段大小得到，5 个菌株均含有 *cry*1*Aa* 和/或 *c* 和/或 *d* 和/或 *e* 基因，只有 Bt + Virus 菌株包含 *cry*1*Ab* 基因。对其它引物对的 PCR 扩增片段分析显示，除 HB-Bt C 菌株外，其余 4 个菌株均含有 *cry*2*A* 基因；只有 JS-Bt C 菌株包含 *cry*1*B* 基因；所有的菌株都含有 *cry*1*I* 基因；没有菌株包含 *cry*1*C* 和 *cry*1*D* 基因。

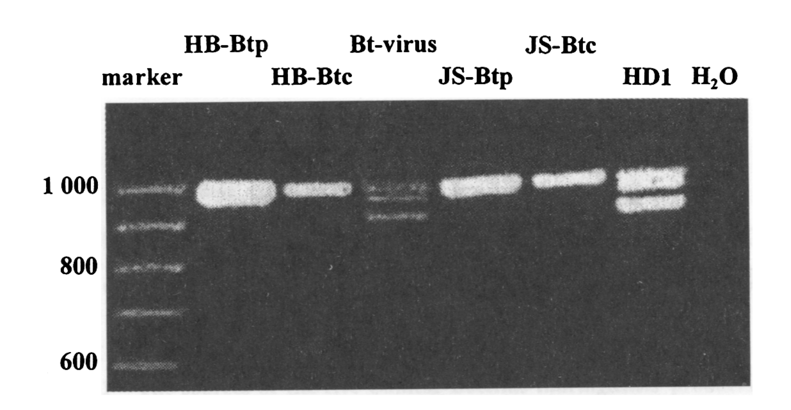


图 1　Lep 2 专一性引物的 PCR 反应产物

Fig.1　PCR product profiles of the five Chinese Bt strains with Lep 2 primer

表 3　用不同伴孢晶体蛋白基因引物对 5 种中国 Bt 进行 PCR 扩增片段大小 *

Table 3　The PCR products of the five Chinese Bt strains with different primers

Bt 菌株 Strains	不同引物的 PCR 扩增片段大小（bp） The PCR products with different primers（bp）						
	Lep1	Lep2	*cry*1*B*	*cry*1*C*	*cry*1*D*	*cry*1*I*	*cry* 2*A*
HB-Bt P	490	986	—	—	—	1 145	1 070
HB-Bt C	490	986	—	—	—	1 145	—
Bt + Virus	490	986, 908	—	—	—	1 145	1 070
JS-Bt P	490	986	—	—	—	1 145	1 070
JS-Bt C	490	986	367	—	—	1 145	1 070
HD-1	490	986, 908					1 070
Bt-CS1				130	290	1 145	
HD-137				130	290	1 145	

* “—”表示没有 PCR 产物（indicates no PCR products）

2.2　*cry*1*B* 引物的 PCR 扩增片段的序列分析

对 *cry*1*B* 专一性引物的 PCR 反应产物进行 DNA 序列测定，得到的序列长度为 367 bp。通过计算机的比较，发现该 PCR 反应产物和 *cry*1*Ba*2 基因的相应序列具有 99.5% 的同源性，因而认定该基因为 *cry*1*Ba*2。

2.3 伴孢晶体蛋白的 SDS-PAGE 分析

伴孢晶体蛋白的 SDS-PAGE 分析结果见图 2。从图谱上可以看到，5 个菌株均有一条分子量为 130 kD 的蛋白带，与 *cry1A* 基因编码的蛋白质分子量大小一致；除 HB-Bt C 菌株外，其余菌株都有一条分子量大小为 70 kD 的蛋白带，与 *cry2A* 基因编码的伴孢晶体蛋白分子量大小一致；JS-Bt C 菌株还有一条分子量为 140 kD 的弱蛋白带，与 *cry1B* 基因编码的伴孢晶体蛋白分子量大小一致；因而 SDS-PAGE 与 PCR 扩增的分析结果一致。

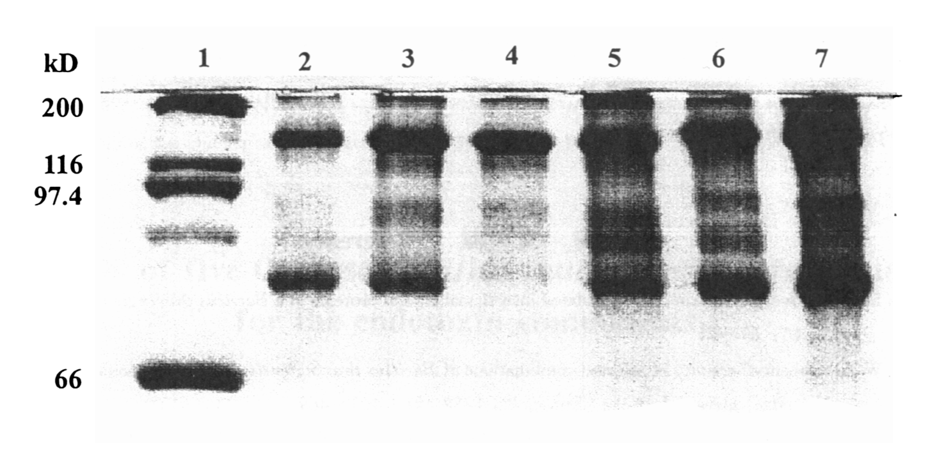


图 2　5 个 Bt 菌株的 SDS-PAGE 扫描图谱

Fig.2　SDS-PAGE scanning profiles of crystal proteins purified from the five Chinese Bt strains

1. 标准样品（MW markers）；2. HD-1 菌株（Strain HD-1）；3. HB-Bt P 菌株（Strain HB-Bt P）；
4. HB-Bt C 菌株（Strain HB-Bt C）；5. Bt + Virus 菌株（Strain Bt + Virus）；
6. JS-Bt P 菌株（Strain JS-Bt P）；7. JS-Bt C 菌株（Strain JS-Bt C）

3 讨论

综合 PCR 分析和 SDS-PAGE 分析结果发现，除 HB-Bt C 菌株不包含 Cry2A 外，其余菌株的主要伴孢晶体蛋白为 Cry1A 和 Cry2A，这些蛋白均对鳞翅目害虫具有很强的毒杀作用[3,4,12]。此外 JS-Bt C 菌株还含有 Cry1B 晶体蛋白，该蛋白既对鳞翅目的小菜蛾和菜青虫具有较高活性[16]，又对鞘翅目害虫具有一定活性[17]；用高压液相色谱（HPLC）技术对该菌株的伴孢晶体蛋白进行进一步分析结果显示，Cry1B 蛋白的含量占该菌株分泌的伴孢晶体蛋白总量的 15%左右（张光美等，未发表数据）。由于两类伴孢晶体蛋白的作用机理不同，因而该菌株很有可能被用来延缓或阻止鳞翅目害虫对 Bt 单一伴孢晶体蛋白基因制剂的抗性发展。

从 PCR 分析结果可以看到，5 个菌株均含有 *cry1I* 基因，该基因编码的伴孢晶体蛋白分子量为 81.2 kD，是一类对鳞翅目害虫具活性或者是对鳞翅目和鞘翅目具有双重活性的蛋白[18,19]，然而 SDS-PAGE 分析却没有发现该分子量大小的蛋白带（图 2）。Shin 等[18]报道该基因在 Bt 菌株间普遍存在，Gleave 等[20]研究发现 *cry1I* 基因缺少一个上游启动子，该基因通常是隐性的，没有发现该蛋白也就不足为奇。此外，Kostichka 等[21]发现从 *B. thuringiensis* AB88 菌株中得到的 CG *cry1I* 基因在培养 12 h 时的表达量达到高峰，而在本研

究中，我们是用培养5天左右收集的蛋白进行SDS-PAGE分析，也许该基因的表达存在时间上的差异。不管怎样，由于该蛋白基因具有一定的应用价值，因而详细情况有待进一步研究。

研究结果还表明，PCR技术是一种检测、鉴定Bt伴孢晶体蛋白基因的快速、准确而简便的方法。把PCR和SDS-PAGE分析结合起来，则既能检测鉴定基因种类，又能确定基因是否表达。如果再结合HPLC技术，则能更详细给出Bt的基因组成和蛋白组成，为生产和应用提供足够信息，为解决害虫对Bt的抗性提供研究基础。

致谢 本文大部分实验工作是在澳大利亚联邦科学与工业组织昆虫研究所（CSIRO，Division of Entomology，Canberra）完成，感谢M. Dumanic、R. Mourant和I. Zolfaghar小姐以及B. James先生的大力帮助。

参 考 文 献 （References）

[1] Lereclus D *et al*. Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis spoOA* mutant. Bio/Technol.，1995，13：67～71

[2] Gardner W A. Enhanced activity of selected combinations of *Bacillus thuringiensis* and beta-exotoxin against fall armyworm（Lepidoptera：Notuidae）larvae. J. Econ. Entomol.，1988，81：463～469

[3] Navon A. Control of lepidopteran pests with *Bacillus thuringiensis*. In：Entwistle P F *et al*. eds. *Bacillus thuringiensis*：An Environmental Biopesticide：Theory and Practice. John Wiley & Sons Ltd，England. 1993，125～146

[4] Höfte H，Whiteley R H. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev.，1989，53：242～255

[5] Crickmore N *et al*. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev.，1998，62：807～813

[6] McGaughey W H. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science，1985，229：193～195

[7] Tabashnik B E *et al*. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth（Lepidoptera：Plutellidae）. J. Econ. Entomol.，1990，82：1 671～1 676

[8] Shelton A M *et al*. Resistance of diamondback moth（Lepidoptera：Plutellidae）to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. J. Econ. Entomol.，1993，85：697～705

[9] Saiki R K *et al*. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science，1988，239：487～491

[10] Bourque S N *et al*. Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol.，1993，59：523～527

[11] Brousseau R *et al*. Arbitrary primer polymerase chain reaction，a powerful method to identify *Bacillus thuringiensis* serovars and strains. Appl. Environ. Microbiol.，1993，54：114～119

[12] Carozzi N B *et al*. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. Appl. Environ. Microbiol.，1991，57：3 057～3 061

[13] Ceron J *et al*. PCR analysis of the cry I insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol.，1994，60：353～356

[14] Thomas W E，Ellar D J. *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal delta-endotoxin：effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo biological control of mosquitos and blackfly. J. Cell Sci.，1983，60：181～197

[15] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature，1970，227：680～685

[16] van Frankenhuyzen K. The challenge of *Bacillus thuringiensis*. In：Entwistle P F *et al*. eds. *Bacillus thuringiensis*：An Environmental Biopesticide：Theory and Practice. John Wiley & Sons Ltd，England. 1993，1～35

［17］ Bradley D *et al*. The insecticidal Cry 1B crystal protein of *Bacillus thuringiensis* ssp. *thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. J. Invertebr. Pathol.，1995，65：162～173

［18］ Shin B S *et al*. Distribution of cry V-type insecticidal protein genes in *Bacillus thuringiensis* and cloning of cry V-type genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus*. Appl. Environ. Microbiol.，1995，61：2 402～2 407

［19］ Tailor R *et al*. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. Mol. Microbiol.，1992，6：1 211～1 217

［20］ Gleave A P *et al*. Screening by polymerase chain reaction of *Bacillus thuringiensis* serotypes for the presence of cry V-like insecticidal protein genes and characterization of a cry V gene cloned from B. *thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Appl. Environ. Microbiol.，1993，59：1 683～1 687

［21］ Kostichka K *et al*. Cloning of a cry V-type insecticidal protein gene from *Bacillus thuringiensis*：the cry V-encoded protein is expressed early in stationary phase. J. Bacteriol.，1996，178：2 141～2 144

Analysis of five Chinese *Bacillus thuringiensis* formulations for the endotoxin components

ZHANG Guang-mei[1]，LIU Shu-sheng[1]，Akhurst Raymond[2]

（1. Department of Plant Protection，Zhejiang University，Hangzhou　310029；

2. CSIRO，Division of Entomology，Canberra ACT 2601，Australia）

Abstract：In this paper，we investigated five *Bacillus thuringiensis*（Bt）strains from four major manufacturers of Bt products in China for the endotoxin components by PCR and SDS-PAGE. All five strains harbour *cry 1Aa* and/or *c*，and/or *d*，and/or *e* genes，only the Bt + Virus strain has *cry1Ab* gene. The *cry1A* class of genes encodes for insecticidal crystal proteins with MW of 130 kD and toxic to Lepidoptera. The JS-Bt C strain contains the *cry1B* gene，which encodes for a 138 kD crystal protein，potentially toxic to both Lepidoptera and Coleoptera. Four of the five strains（HB-Bt P，Bt + Virus，JS-Bt P，and JS-Bt C）harbour the *cry2Aa* and/or *b* genes，which encode 70 kD crystal proteins toxic to Lepidoptera. All of the five strains have the *cry1I* gene which appears to be cryptic in all the strains. None of the five strains harbours the *cry1C* and *cry1D* genes.

Key words：*Bacillus thuringiensis*；insecticidal crystal proteins；genes；PCR；SDS-PAGE